

**This Page Is Inserted by IFW Operations
and is not a part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- **BLACK BORDERS**
- **TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- **FADED TEXT**
- **ILLEGIBLE TEXT**
- **SKEWED/SLANTED IMAGES**
- **COLORLED PHOTOS**
- **BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS**
- **GRAY SCALE DOCUMENTS**

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

**As rescanning documents *will not* correct images,
please do not report the images to the
Image Problems Mailbox.**

THIS PAGE BLANK (USPTO)

日本国特許庁

23.06.00

PATENT OFFICE
JAPANESE GOVERNMENT

EU

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出願年月日
Date of Application:

1999年 6月25日

REC'D 11 AUG 2000

出願番号
Application Number:

平成11年特許願第180600号

WIPO PCT

出願人
Applicant(s):

科学技術振興事業団

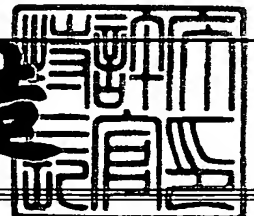
PRIORITY
DOCUMENT

SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)

2000年 7月28日

特許庁長官
Commissioner,
Patent Office

及川耕造



出証番号 出証特2000-3058443

【書類名】 特許願
 【整理番号】 A031P46
 【提出日】 平成11年 6月25日
 【あて先】 特許庁長官殿
 【国際特許分類】 A01K 67/027

【発明者】

【住所又は居所】 宮城県仙台市青葉区中山 7 - 1 6 - 1 8

【氏名】 中村 晃

【発明者】

【住所又は居所】 宮城県仙台市青葉区国見ヶ丘 2 - 2 2 - 1

【氏名】 貫和 敏博

【発明者】

【住所又は居所】 宮城県仙台市青葉区中山 4 - 1 8 - 1 - 5 0 6

【氏名】 高井 俊行

【特許出願人】

【識別番号】 396020800

【氏名又は名称】 科学技術振興事業団

【代表者】 中村 守孝

【代理人】

【識別番号】 100107984

【弁理士】

【氏名又は名称】 廣田 雅紀

【手数料の表示】

【予納台帳番号】 044347

【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 図面 1

【物件名】 要約書 1

【プルーフの要否】 要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 グッドパスチャー症候群モデルマウス

【特許請求の範囲】

【請求項1】 免疫グロブリンFcγレセプターIIB遺伝子機能が染色体上で欠損した非ヒト動物をタイプIVコラーゲンで免疫することにより得られることを特徴とするグッドパスチャー症候群モデル非ヒト動物。

【請求項2】 非ヒト動物が、マウスであることを特徴とする請求項1記載のグッドパスチャー症候群モデル非ヒト動物。

【請求項3】 免疫グロブリンFcγレセプターIIB遺伝子機能が染色体上で欠損した非ヒト動物をタイプIVコラーゲンで免疫する前後又は免疫すると同時に、該非ヒト動物に被検物質を投与し、グッドパスチャー症候群の発現の程度を指標として評価することを特徴とするグッドパスチャー症候群治療薬のスクリーニング方法。

【請求項4】 グッドパスチャー症候群モデル非ヒト動物に被検物質を投与し、グッドパスチャー症候群の発現の程度を指標として評価することを特徴とするグッドパスチャー症候群治療薬のスクリーニング方法。

【請求項5】 グッドパスチャー症候群の発現の程度を指標として評価するに際し、対照として用いた野生型の非ヒト動物との比較評価を行うことを特徴とする請求項3又は4記載のグッドパスチャー症候群治療薬のスクリーニング方法。

【請求項6】 グッドパスチャー症候群の発現が、びまん性肺胞出血、糸球体腎炎及び抗腎糸球体基底膜抗体出現のうちの少なくとも1つであることを特徴とする請求項3～5のいずれか記載のグッドパスチャー症候群治療薬のスクリーニング方法。

【請求項7】 非ヒト動物が、マウスであることを特徴とする請求項3～6のいずれか記載のグッドパスチャー症候群治療薬のスクリーニング方法。

【請求項8】 ヒトの被験細胞からFcγレセプターIIB遺伝子を抽出し、その遺伝子機能の欠損の有無を調べることを特徴とするグッドパスチャー症候群の早期診断法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は、グッドパスチャー症候群モデル非ヒト動物や、これを用いたグッドパスチャー症候群治療薬のスクリーニング方法や、グッドパスチャー症候群の早期診断法に関する。

【0002】

【従来の技術】

びまん性肺胞出血、糸球体腎炎及び抗腎糸球体基底膜抗体出現の3つを合わせもつグッドパスチャー症候群は、ヴェゲナー肉芽腫症 (Wegener's granulomatosis)、全身性壊死性血管炎及び全身性エリテマトーデス (SLE) 等と臨床像として共通性があるが、患者血清中に腎糸球体基底膜と肺胞上皮基底膜に対する共通する抗体が存在し、これらが標的組織に結合してII型過敏症反応に基づく炎症病巣を惹起させると考えられている (J. Exp. Med. 126, 989-1004, 1987)。グッドパスチャー症の診断は、上記の臨床像の特徴のほかに、腎糸球体基底膜への免疫グロブリン (以下「Ig」という) 沈着の証明によってなされ、抗基底膜抗体の大部分はIgG画分に属し、近年、タイプIVコラーゲンの α_3 鎖の一部に対する自己抗体と同定されている (Cell Mol. Biol. 5, 107-112, 1991)。

【0003】

また、グッドパスチャー症候群は、広い年齢層にわたって発症し、早期診断及び早期治療がなされなければ80%の患者は1年以内に腎症の悪化により死亡し、30%の患者は肺出血によって死亡する。早期治療によって、最近ではグッドパスチャー症の救命率は約50%にまで向上しているが、経口ステロイド剤又は経口免疫抑制剤のみの治療では不十分で、肺出血に対しては高用量のプレドニルパルス療法が効果的である。しかし、腎症に対してはパルス療法は十分ではなく、血漿交換と高用量プレドニル、それにサイクロホスファミドの併用が有効であるとされ、また、高度な腎障害では、人工透析あるいは腎移植の対象となっている。

【0004】

他方、免疫系などの細胞の表面上には、IgのFc部分を認識して結合するレセプター（以下「FcR」という）が存在し、その中でも体液中のIgGのγ鎖に特異的に結合する受容体蛋白質であるFcγレセプター（以下「FcγR」という）は遺伝子構造の類似性に基づいてタイプI（CD64抗原）、タイプII（CD32抗原）、タイプIII（CD16抗原）の3種に大きく分類されている。これらのうち、FcγRIIは、他のFcRとは異なりモノマーのIgGに対して低親和性であり、免疫複合体となった多価IgGと結合し、単球、マクロファージ、多形核白血球（PMN）、マスト細胞、血小板、いくつかのT細胞リンパ球及びいくつかのB細胞リンパ球を含む造血幹細胞に広く発現する。また、FcγRIIには遺伝子配列が異なるFcγRIIA、FcγRIIB及びFcγRIICの3種類の受容体が存在しており、いずれの染色体も1q23に位置していることも知られている。

【0005】

上記FcγRIIBは、他のFcRとは異なり、γ鎖と会合することなく、しかも細胞内領域に抑制性シグナルを伝達するアミノ酸配列（ITIM: Immunoreceptor Tyrosine-based Inhibition Motif）を有している（Immunol. Rev. 125, 49-76, 1992、Science 256, 1808-1812, 1992）。このようなFcγRIIBの生理的機能を解明するために、本発明者らはFcγRIIB欠損マウスを既に作出し（Nature 379, 346-349, 1996）、FcγRIIB欠損マウスをタイプIIコラーゲンで免疫することによる関節炎モデルマウス（J. Exp. Med. 189, 187-194, 1999）や、自己免疫疾患モデル動物を作製した（特開平08-289699号公報）。

【0006】

【発明が解決しようとする課題】

早期診断及び早期治療をしなければ80%の患者が1年以内に腎症の悪化により死亡し、そのうち30%の患者は肺出血によって死亡するというグッドパスチャー症候群の病態の研究やグッドパスチャー症候群の治療法の開発に有効な動物モデルは現在まで知られていない。本発明の課題は、その発症機構を解明するための適切な病態モデルが存在しておらず治療方法の開発が遅れているグッドパス

チャー症候群の治療の道を拓くグッドパスチャー症候群モデル非ヒト動物や、これを用いたグッドパスチャー症候群治療薬のスクリーニング方法や、グッドパスチャー症候群の早期診断法を提供することにある。

【0007】

【課題を解決するための手段】

本発明者らは、FcγRIIBの生理的機能の解明について鋭意研究を進めていたところ、FcγRIIB遺伝子機能が染色体上で欠損したマウス、すなわちFcγRIIBノックアウトマウスをタイプIVコラーゲンで免疫することにより、該FcγRIIBノックアウトマウスがグッドパスチャー症候群の徴候を示すことを見出し、本発明を完成するに至った。

【0008】

すなわち本発明は、免疫グロブリンFcγレセプターIIB遺伝子機能が染色体上で欠損した非ヒト動物をタイプIVコラーゲン又はそのアミノ酸配列の一部を含むペプチドで免疫することにより得られるグッドパスチャー症候群モデル非ヒト動物、特にグッドパスチャー症候群モデルマウスに関する。

【0009】

また本発明は、免疫グロブリンFcγレセプターIIB遺伝子機能が染色体上で欠損した非ヒト動物をタイプIVコラーゲンで免疫する前後又は免疫すると同時に、該非ヒト動物に被検物質を投与し、グッドパスチャー症候群の発現の程度を指標として評価することを特徴とするグッドパスチャー症候群治療薬のスクリーニング方法や、グッドパスチャー症候群モデル非ヒト動物に被検物質を投与し、グッドパスチャー症候群の発現の程度を指標として評価することを特徴とするグッドパスチャー症候群治療薬のスクリーニング方法や、グッドパスチャー症候群の発現の程度を指標として評価するに際し、対照として用いた野生型の非ヒト動物との比較評価を行うことを特徴とする上記グッドパスチャー症候群治療薬のスクリーニング方法や、グッドパスチャー症候群の発現が、びまん性肺胞出血、糸球体腎炎及び抗腎糸球体基底膜抗体出現のうちの少なくとも1つであることを特徴とする上記グッドパスチャー症候群治療薬のスクリーニング方法や、非ヒト動物がマウスであることを特徴とする上記グッドパスチャー症候群治療薬のスクリー

ニング方法に関する。

【0010】

さらに本発明は、ヒトの被験細胞からFc γ RIIB遺伝子を抽出し、その遺伝子機能の欠損の有無を調べることを特徴とするグッドパスチャー症候群の早期診断法に関する。

【0011】

【発明の実施の形態】

本発明において、Fc γ RIIB遺伝子機能が染色体上で欠損した非ヒト動物とは、Fc γ RIIBをコードする非ヒト動物の内在性遺伝子が破壊・欠損・置換等の遺伝子変異により不活性化され、Fc γ RIIBを発現する機能を失なった非ヒト動物をいう。また本発明における非ヒト動物としては、マウス、ラット等の齧歯目動物を具体的に挙げることができるが、これらに限定されるものではない。

【0012】

例えば、Fc γ RIIB遺伝子機能が染色体上で欠損したマウス、すなわちFc γ RIIBノックアウトマウスは、本発明者らの前掲の文献(Nature 379, 346-349, 1996)に記載する方法等によって作製することができる。具体的には、マウス遺伝子ライブラリーからPCR等の方法により得られた遺伝子断片を用いて、Fc γ RIIB遺伝子をスクリーニングし、スクリーニングされたFc γ RIIB遺伝子をウイルスベクター等を用いてサブクローンし、DNAシーケンシングにより特定する。このクローンのS₂エキソン及びEC₁エキソンを含むフラグメントをpMC1ネオ遺伝子カセット等に置換することによって、ターゲットベクターを作製する。

【0013】

この線状化されたベクターをエレクトロポレーション（電気穿孔）法等によってES細胞に導入し、相同的組換えを行い、その相同的組換え体の中から、G418等に抵抗性を示すES細胞を選択し、その細胞のクローンをマウスの胚盤胞中にマイクロインジェクションし、かかる胚盤胞を仮親のマウスに戻し、キメラマウスを作製する。このキメラマウスを野生型のマウスとインタークロスさせると、ヘテロ接合体マウスを得ることができ、また、このヘテロ接合体マウスをイ

ンタークロスさせることによって、Fc γ RIIBノックアウトマウスを得ることができる。

【0014】

本発明において、Fc γ RIIB遺伝子機能が染色体上で欠損した非ヒト動物にグッドパスチャー症候群を誘導するために用いられる免疫源としては、タイプIVコラーゲンを具体的に例示することができるが、Fc γ RIIB遺伝子機能が染色体上で欠損した非ヒト動物にグッドパスチャー症候群を誘導することができるものであれば、タイプIVコラーゲンのアミノ酸配列の一部を含むペプチドなどどのようなものでもよい。

【0015】

本発明において、グッドパスチャー症候群モデル非ヒト動物とは、びまん性肺胞出血、糸球体腎炎及び抗腎糸球体基底膜抗体出現の3つの徴候を合わせもつマウス等の非ヒト動物であればどのような非ヒト動物でもよく、例えばFc γ RIIB遺伝子機能が染色体上で欠損した非ヒト動物をタイプIVコラーゲンで免疫することにより得ることができる。

【0016】

本発明におけるグッドパスチャー症候群治療薬のスクリーニング方法としては、Fc γ RIIB遺伝子機能が染色体上で欠損した非ヒト動物をタイプIVコラーゲンで免疫しグッドパスチャー症候群を誘導する前や後あるいはタイプIVコラーゲンで免疫しグッドパスチャー症候群を誘導すると同時に、該非ヒト動物にグッドパスチャー症候群治療薬の候補となる被検物質を投与し、グッドパスチャー症候群の発現（諸症状の出現）の程度を指標として評価する方法や、グッドパスチャー症候群モデル非ヒト動物にグッドパスチャー症候群治療薬の候補となる被検物質を投与し、グッドパスチャー症候群の発現の程度を指標として評価する方法を挙げることができる。

【0017】

また、グッドパスチャー症候群の発現の程度を指標として評価するに際し、グッドパスチャー症候群モデル非ヒト動物と同種の野生型の非ヒト動物を対照として用い、グッドパスチャー症候群モデル非ヒト動物と対照としての同種の野生型

非ヒト動物とにおけるグッドパスチャー症候群の発現の程度を比較評価することもできる。

【0018】

グッドパスチャー症候群の発現（諸症状の出現）の程度の指標としては、肺組織におけるびまん性肺胞出血、腎組織における糸球体腎炎及び抗腎糸球体基底膜抗体出現のうちの少なくともいずれか1つを好ましく例示することができるが、この他、肺胞に沈着している抗基底膜抗体の出現、血清クレアチニンのレベル又は糸球体ろ過値等を挙げることもできる。このような指標のうち少なくとも1つについて評価することにより、グッドパスチャー症候群治療薬をスクリーニングすることができる。

【0019】

本発明のグッドパスチャー症候群の早期診断法としては、ヒトの被験細胞からFcγRIIB遺伝子を抽出し、その遺伝子機能の欠損の有無を調べることにより診断する方法を具体的に挙げる事ができる。そして、FcγRIIB遺伝子源としてのヒトの被験細胞としては、例えば、マクロファージ、マスト細胞、B細胞、樹状細胞等を挙げる事ができ、またFcγRIIB遺伝子の遺伝子機能の欠損の有無を調べる方法としては、クローニングされたFcγRIIB遺伝子を常法によりヒト株化細胞で発現させ、この発現産物のFcγRIIB機能、例えばIgG免疫複合体との結合を調べる方法を例示することができる。発現産物にFcγRIIB機能が欠損している場合は、グッドパスチャー症候群が発症する可能性があり、上記のように、FcγRIIB遺伝子の遺伝子機能の欠損の有無を調べることによりグッドパスチャー症候群の早期診断法が可能となる。

【0020】

以下に、実施例等を挙げてこの発明を更に具体的に説明するが、この発明の技術的範囲はこれらの実施例に限定されるものではない。

参考例（FcγRIIB欠損マウスの作製）

129/Sv/J系統由来のマウスのゲノムDNAライブラリーをスクリーニングすることによって、FcγRIIB遺伝子のゲノムDNAのクローンを単離した。このクローンのS₂及びEC₁の2つの独立したエキソンを含む2.65Kb

のフラグメントを pMC1 ネオ遺伝子カセット（東洋紡社製）に、置換することによってターゲットベクターを作製した。この線状化したベクターをエレクトロポレーションによって ES 細胞（J1）に導入し、相同的組換えを行った。

【0021】

上記の相同的組換えを起こした ES 細胞から ES クローンを単離し、G418 及び GANC（ガンシクロピア）に対してネオマイシン耐性 ES クローンをスクリーニングし、サザンブロット法によって相同的組換え体を同定した。その同定された相同的組換え体からゲノム DNA を単離して、HindIII でダイジェストし、pMC1 ネオ遺伝子カセットを含むターゲティングされた対立遺伝子を含んでいることを確認した。かかる確認された ES クローンを胚盤胞中にマイクロインジェクションし、キメラマウスを作製し、作製されたマウスを野生型の C57BL/6J マウスとインタークロスさせることによってヘテロ接合体マウスを得て、また、ホモ接合体マウスを得るために、このヘテロ接合体マウスをインタークロスさせて、FcγRIIB 遺伝子が染色体上で欠損した欠損マウス及びその野生型マウスを作製した。

【0022】

実施例 1（グッドパスチャー症候群モデルマウスの作製）

1 mM の HCl 溶液（pH 3.0）に 3 mg/ml の蛋白濃度で牛水晶体から調製されたセルマトリックス IV（新田ゼラチン株式会社製）に、最終濃度で 1 mM になるように NaOH を加えてタイプ IV コラーゲン（pH 8.0）を作製した。このタイプ IV コラーゲン（pH 8.0）3 mg/ml と、流動パラフィン、界面活性剤及び結核死菌からなる完全フロイントアジュバンド（CFA）3 mg/ml とを連結シリンジ中で混合して、またタイプ IV コラーゲン（pH 8.0）3 mg/ml と、流動パラフィンと界面活性剤とからなる不完全フロイントアジュバンド（IFA）3 mg/ml とを連結シリンジ中で混合して、2 種類のエマルジョンを作製した。

【0023】

上記参考例記載の方法により作製した FcγRIIB 遺伝子欠損マウス（8 週齢：雌雄差なし）をエーテルで麻酔し尾根部を剃毛し、タイプ IV コラーゲンと CFA

Aとをそれぞれ150 μ g含むエマルジョン100 μ lをマウスの皮内に注射して一次免疫を行い、その一次免疫後、14、28及び42日目に、タイプIVコラーゲンとIFAとをそれぞれ150 μ g含むエマルジョン100 μ lを皮内に注射し、56日目にマウスを屠殺し、肺及び腎臓組織を採取した。また、対照としては野生型マウスを用いた。

【0024】

図1に示すように、タイプIVコラーゲンで免疫されたFc γ RIIB遺伝子欠損マウス(Fc γ RIIB^{-/-})は対照の野生型マウス(WT)に比べて、肺組織においてマクロファージや好中球等の炎症細胞浸潤を含む広い範囲で著しい肺胞出血を示し、また、図2に示すように、腎組織において糸球体や近位尿細管の変性が生起しており、糸球体腎炎を主体とする腎病変が生じていた。これらの結果から、Fc γ RIIB遺伝子欠損マウスをタイプIVコラーゲンで免疫すると、グッドパスチャー症候群モデルマウスが得られることがわかる。

【0025】

実施例2 (タイプIVコラーゲンに対する抗体価の検査)

Fc γ RIIBノックアウトマウス、FcR γ ノックアウトマウス、野生型マウスのそれぞれに、タイプIVコラーゲンで免疫し、所定期間の後、眼窩より採血を行ない、文献(Cell. Immunol. 145, 299-310, 1992)記載のELISA分析に改良を加えた以下の方法により、タイプIVコラーゲンに対する抗体価を検査した。

【0026】

リン酸緩衝溶液(PBS)1mlに20 μ gのタイプIVコラーゲンを溶解させ、この溶解液を1ウェル当たり50 μ lの割合で用い、96ウェルマイクロプレート(Falcon; Becton Dickinson Labware社製)を4℃にて一晚コーティングした後、0.05%のTween20と0.1%のBSAを含むPBSで3回洗浄し、1ウェル当たり250 μ lの0.2%のBSAを含むPBSで4℃にて一晚ブロックした。

【0027】

次に上記血液から得られた血清を400~20000倍に希釈し、その希釈し

た血清を1ウェル当たり50 μ lの割合で上記96ウェルマイクロプレートに加え、4℃にて一晩反応させた。反応後、96ウェルマイクロプレートを0.05%のTween 20を含むPBSで3回洗浄し、西洋ワサビペルオキシダーゼ（シグマ社製）が結合したヤギ抗マウスIgG1、IgG2a、IgG2b又はIgMを200倍に希釈したものを50 μ l加えて、4℃にて2時間インキュベートした。インキュベート後、再び0.05%のTween 20を含むPBSで3回洗浄し、0.1mlのTureBlue Peroxidase Substrate (Kirkegaard & Perry Labs社製)と共に30分間室温で酵素反応を行った。その後、マイクロプレートリーダー（Biolumin 960; Molecular Dynamics社製）でOD450nmを測定した。結果を図3に示す。

【0028】

これらの結果から、Fc γ RIIBノックアウトマウス（IIB-KO）は、FcR γ ノックアウトマウス（ γ -KO）や野生型マウス（Wild）に比べて、タイプIVコラーゲンに対する抗体価（IgG1、IgG2a、IgG2b又はIgM）の上昇が認められ、グッドパスチャー症候群の所見と矛盾していないことから、グッドパスチャー症候群モデルマウスが作製できたことがわかった。

【0029】

【発明の効果】

本発明によると、グッドパスチャー症候群モデル非ヒト動物や、これを用いたグッドパスチャー症候群治療薬のスクリーニング方法や、グッドパスチャー症候群の早期診断法を提供することができるので、その発症機構を解明するための適切な病態モデルが存在しておらず治療方法の開発が遅れているグッドパスチャー症候群の治療の道を拓くことができる。

【図面の簡単な説明】

【図1】

タイプIVコラーゲン免疫によるグッドパスチャー症候群様の肺胞出血を示す図である。

【図2】

タイプIVコラーゲン免疫によるグッドパスチャー症候群様の糸球体腎炎を示す

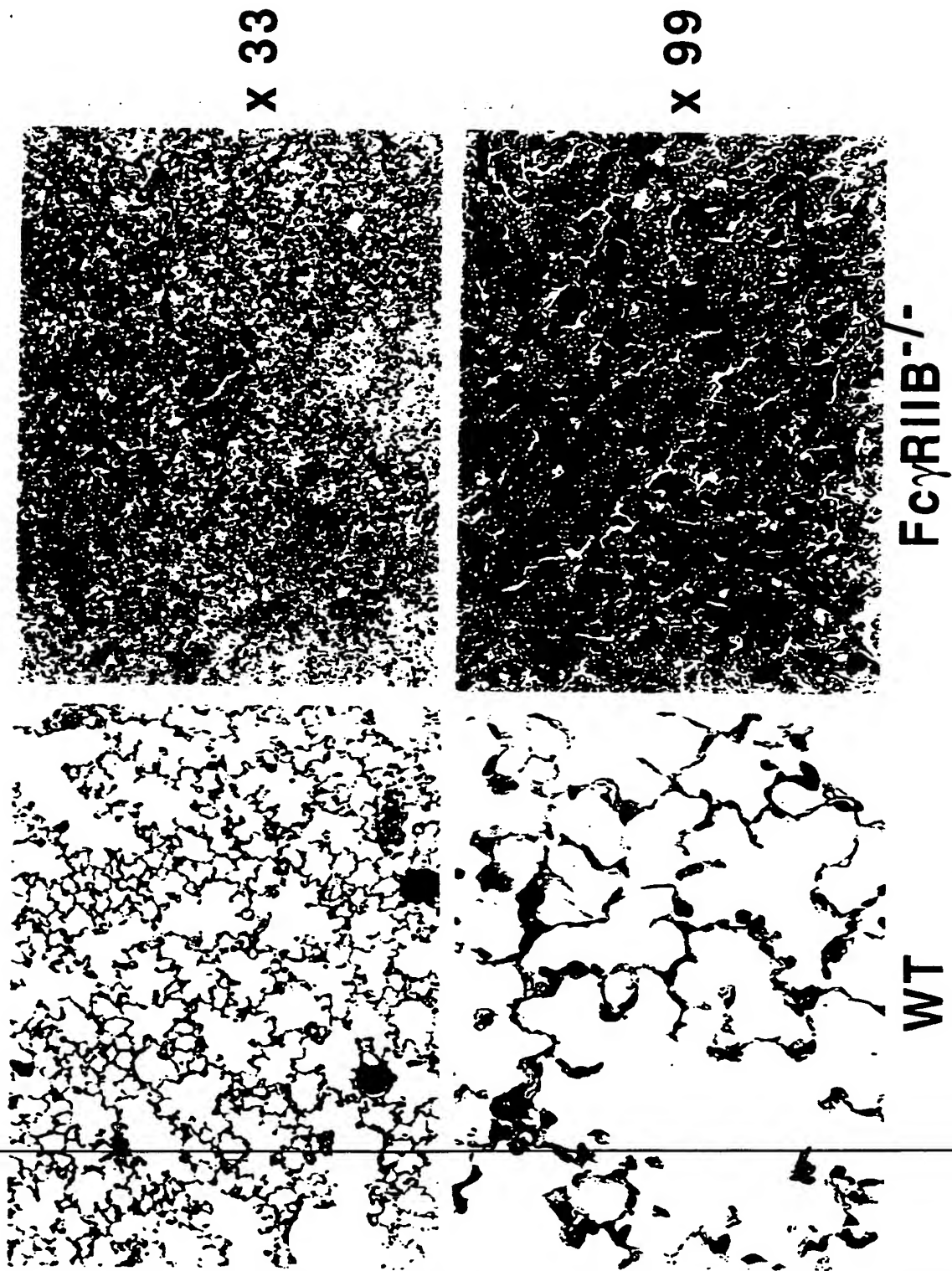
図である。

【図 3】

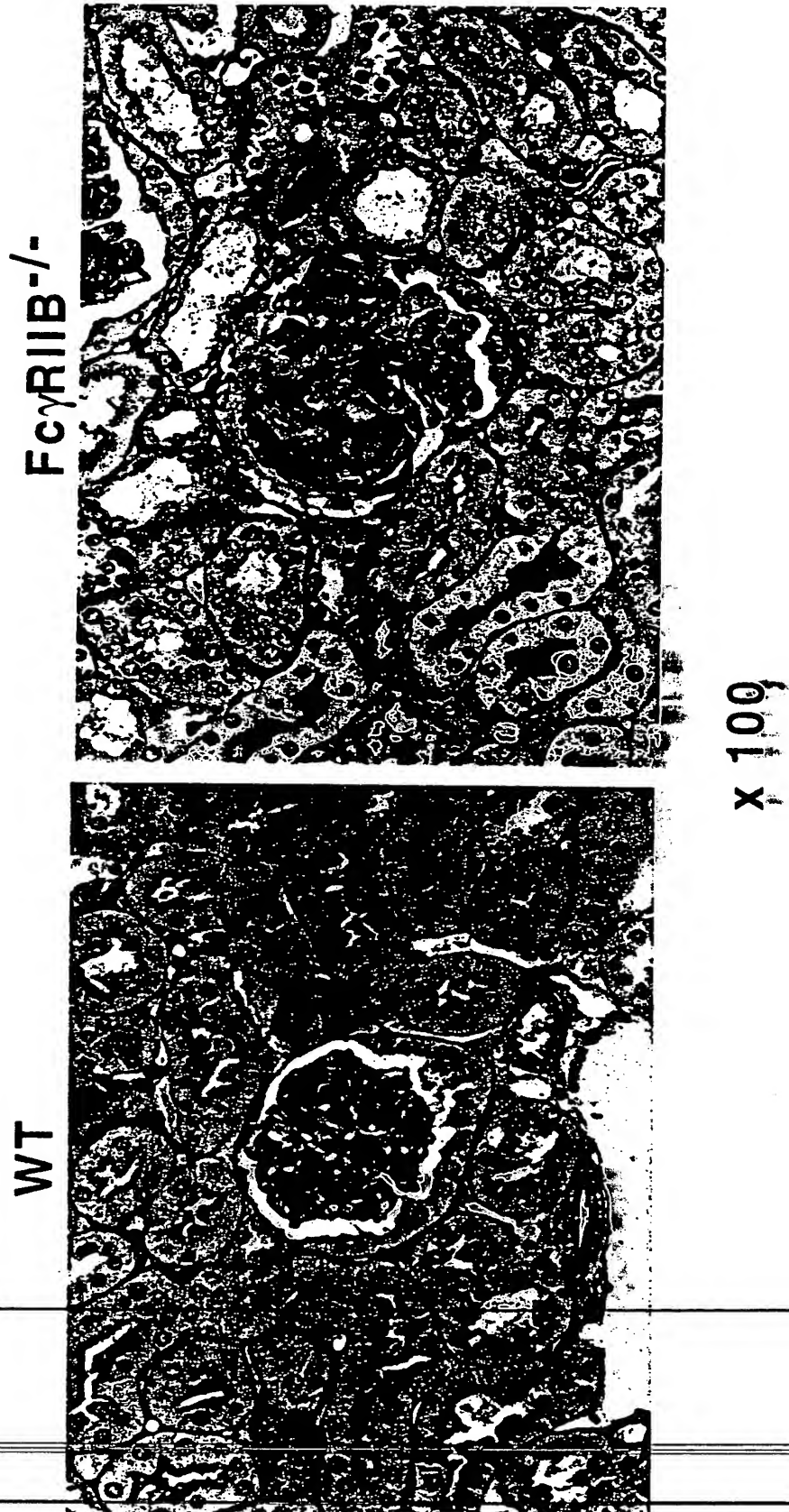
タイプIVコラーゲン免疫に対する抗体価のレベルを示す図である。

【書類名】 図面

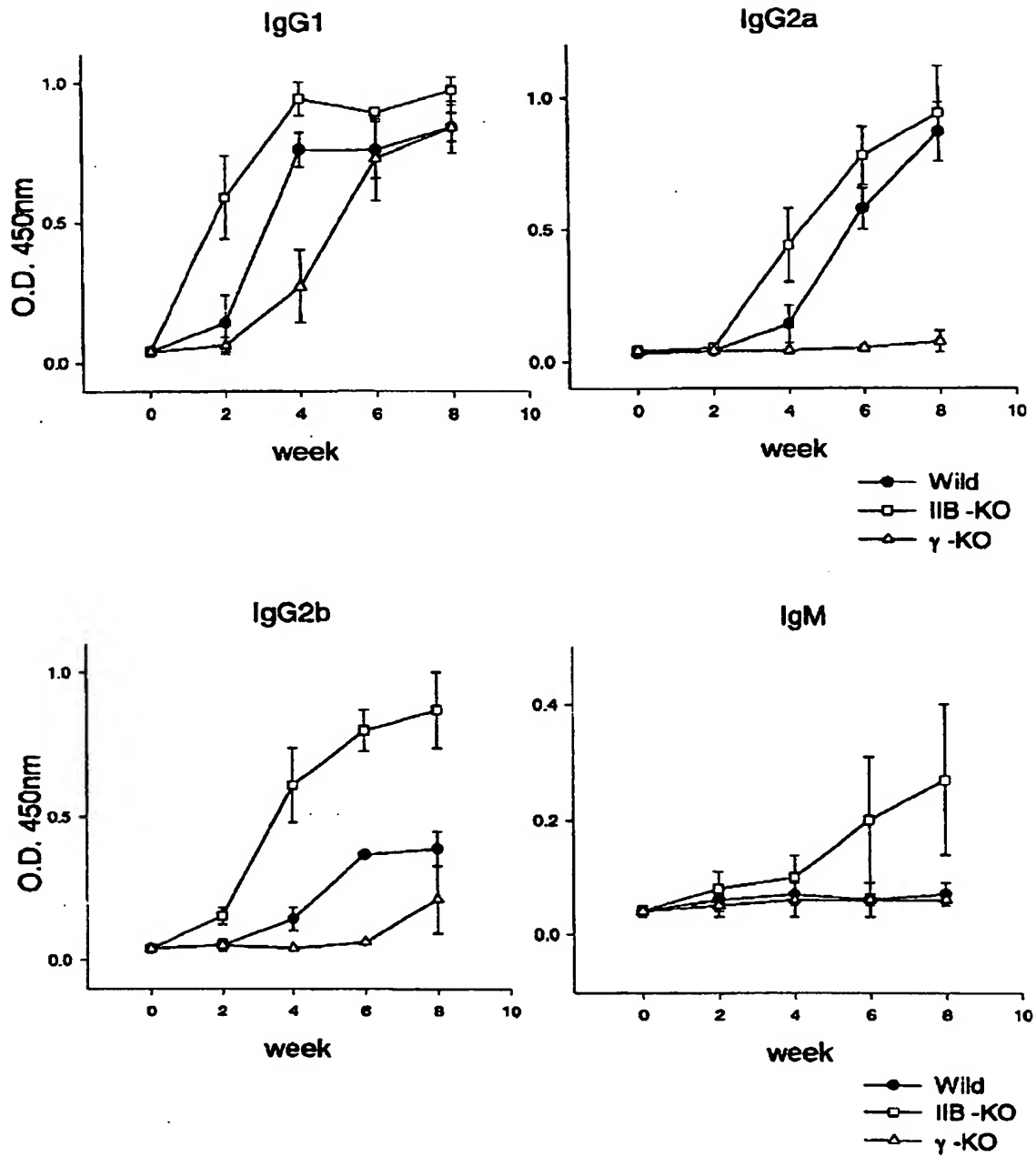
【図 1】



【図2】



【図 3】



【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 適切な病態モデルが存在しておらず治療方法の開発が遅れているグッドパスチャー症候群の治療の道を拓くグッドパスチャー症候群モデル非ヒト動物や、これを用いたグッドパスチャー症候群治療薬のスクリーニング方法や、グッドパスチャー症候群の早期診断法を提供すること。

【解決手段】 免疫グロブリンFc γ レセプターIIBノックアウトマウスをタイプIVコラーゲンで免疫し、グッドパスチャー症候群を誘導し、グッドパスチャー症候群モデルマウスを作製する。また、このグッドパスチャー症候群モデルマウスに被検物質を投与し、びまん性肺胞出血、糸球体腎炎及び抗腎糸球体基底膜抗体出現等のグッドパスチャー症候群の発現の程度を指標として評価することにより、グッドパスチャー症候群治療薬をスクリーニングする。

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号 [3 9 6 0 2 0 8 0 0]

1. 変更年月日 1998年 2月24日

 [変更理由] 名称変更

 住 所 埼玉県川口市本町4丁目1番8号

 氏 名 科学技術振興事業団

THIS PAGE BLANK (USPTO)